



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑧7 EP 0 637 998 B1

⑩ DE 693 03 898 T 2 5,296,375

⑤1 Int. Cl. 6:  
B 01 L 3/00  
C 12 M 3/08  
G 01 N 15/10

②1	Deutsches Aktenzeichen:	693 03 898.5
⑧6	PCT-Aktenzeichen:	PCT/US93/04018
⑧6	Europäisches Aktenzeichen:	93 910 891.6
⑧7	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 93/22055
⑧6	PCT-Anmeldetag:	29. 4. 93
⑧7	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	11. 11. 93
⑧7	Erstveröffentlichung durch das EPA:	15. 2. 95
⑧7	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	31. 7. 96
④7	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	20. 2. 97

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1

01.05.92 US 877536	01.05.92 US 877661
01.05.92 US 877662	01.05.92 US 877701
01.05.92 US 877702	

⑦3 Patentinhaber:

The Trustees of the University of Pennsylvania,  
Philadelphia, Pa., US

⑦4 Vertreter:

Schwabe, Sandmair, Marx, 81677 München

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL

⑦2 Erfinder:

WILDING, Peter, Paoli, PA 19301, US; KRICKA, Larry,  
J., Berwyn, PA 19312, US; ZEMEL, Jay, N.,  
Jenkintown, PA 19046, US

⑤4 FLUESSIGKEITSBEHANDLUNG IN MIKROFABRIZIERTEN ANALYTISCHEN VORRICHTUNGEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 693 03 898 T 2

BEST AVAILABLE COPY

DE 693 03 898 T 2

93 910 891.6

EP 0 637 998

### Hintergrund der Erfindung

Die Erfindung betrifft allgemein ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Durchführung von Analysen. Die Erfindung betrifft insbesondere den Aufbau und die Konstruktion von kleinen, im allgemeinen Einwegmodulen, in denen eine flüssige Probe analysiert werden kann.

In den letzten Jahrzehnten wurden zur Durchführung von Analysen bei biologischen Proben für verschiedene diagnostische und Beobachtungszwecke eine große Anzahl von Protokollen, Testkits und Packungen entwickelt. Immunoassays, Agglutinationsassays und Analysen, die auf der Polymerasekettenreaktion basieren, unterschiedliche Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen und eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit von Spezies in einer komplexen Probe wurden zur Bestimmung der Anwesenheit oder der Konzentration verschiedener biologischer Verbindungen oder Verunreinigungen, oder der Anwesenheit von bestimmten Zelltypen verwendet.

Vor kurzer Zeit wurden zur Handhabung biologischer Proben und zur Durchführung bestimmter klinischer Untersuchungen kleine Wegwerfvorrichtungen entwickelt. Shoji et al. beschreiben die Verwendung eines sehr kleinen Blutgasanalysators, der aus einem Silikon-Wafer hergestellt wurde. Shoji et al., *Sensors and Actuators* 15 (1988), 101-107. Sato et al. beschreiben eine Zellfusionstechnik unter Verwendung mikromechanischer Siliziumvorrichtungen. Sato et al., *Sensors and Actuators* A21-A23 (1990), 948-953. Ciba Corning Diagnostics Corp. (USA) stellten ein mikroprozessorgesteuertes Laserphotometer zum Nachweis der Blutgerinnung her.

Die Mikroverarbeitungstechnologie stammt von der Mikroelektronikindustrie. Angell et al., *Scientific American* 248 (1983), 44-55. Die Mikroverarbeitungstechnologie ermöglichte die Herstellung von mikroverarbeiteten Vorrichtungen mit

strukturellen Elementen mit minimalen Abmessungen im Bereich von Zehntel Mikrometer (die Abmessungen biologischer Zellen) bis Nanometer (die Abmessungen einiger biologischer Makromoleküle). Dieser Maßstab wird hier als "Mesoscale"-Maßstab bezeichnet. Die meisten Experimente mit Mesoscale-Strukturen beinhalteten Untersuchungen der Mikromechanik, d.h. mechanischer Bewegung und Strömungseigenschaften. Das Potential von Mesoscale-Strukturen wurde in den Naturwissenschaften nicht vollständig erforscht.

- Brunette (Exper. Cell Res. 167 (1986), 203-217 und 164 (1986), 11-26) erforschten das Verhalten von Fibroblasten und Epithelzellen in Vertiefungen in Silizium, mit Titan beschichteten Polymeren und dergleichen. McCartney et al. (Cancer Res. 41 (1981), 3046-3051) untersuchten das Verhalten von Tumorzellen in mit Vertiefungen versehenen Kunststoffsubstraten. LaCelle (Blood Cells 12 (1986), 179-189) untersuchte die Strömung von Leukozyten und Erythrozyten in Mikrokapillaren, um einen Einblick in die Mikrozirkulation zu erlangen. Hung und Weissman erläutern eine Untersuchung von fluider Dynamik in mikroverarbeiteten Kanälen, zeigten jedoch keine Ergebnisse hinsichtlich einer analytischen Vorrichtung. Hung et al., Med. and Biol. Engineering 9 (1971), 237-245 und Weissman et al., Am. Inst. Chem. Eng. J. 17 (1971), 2530. Columbus et al. verwendeten eine Sandwichanordnung, die aus zwei orthogonal ausgerichteten, mit V-förmigen Vertiefungen versehenen Schichten zur Steuerung der kapillaren Strömung von biologischen Flüssigkeiten besteht, um in einer experimentellen Mehrkanal-Untersuchungsvorrichtung ionenselektive Elektroden zu trennen. Columbus et al., Clin. Chem. 33 (1987), 1531-1537. Masuda et al. und Washizu et al. erläuterten die Verwendung einer Flüssigkeitsströmungskammer zur Manipulation von Zellen (beispielsweise Zellfusion). Masuda et al., Proceedings IEEE/IAS Meeting, (1987), 1549-1553, und Washizu et al., Proceedings IEEE/IAS Meeting, (1988), 1735-1740. Im Stand der Technik

wurde das Potential der Verwendung von Mesoscale-Maßstab-Vorrichtungen zur Analyse biologischer Flüssigkeiten und zum Nachweis von Mikroorganismen nicht vollständig untersucht.

Die gegenwärtig zum Nachweis von Mikroorganismen verwendeten analytischen Techniken sind nur selten automatisiert und erfordern im allgemeinen die Inkubation eines geeigneten Mediums um die Anzahl der Organismen zu steigern, und verwenden immer visuelle und/oder chemische Verfahren, um den Stamm oder die Sub-Spezies zu identifizieren. Diese derartigen Verfahren innewohnende Verzögerung erfordert es, daß vor der definitiven Identifizierung der Natur einer Infektion medizinisch eingegriffen wird. Hinsichtlich industrieller, öffentlicher Gesundheit oder klinischer Umgebung können derartige Verzögerungen schwerwiegende Konsequenzen nach sich ziehen. Es besteht ein Bedarf nach geeigneten Systemen zum schnellen Nachweis von Mikroorganismen.

Eine Aufgabe der Erfindung ist es, analytische Systeme mit optimaler Umgebung für die Reaktion zur Verfügung zu stellen, die eine Probe im Mikrovolumen analysieren, Substanzen, die in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, nachweisen, und analytische Ergebnisse schnell erstellen können. Eine andere Aufgabe besteht darin, leicht in Massen herzustellende, nach einmaligem Gebrauch wegwerfbare, kleine Vorrichtungen (beispielsweise weniger als 1 Milliliter Volumen) mit funktionellen Elementen im Mesoscale-Maßstab zur Verfügung zu stellen, die zu schnellen, automatisierten Analysen im Bereich von biologischen und anderen Anwendungen befähigt sind. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Familie derartiger Vorrichtungen zur Verfügung zu stellen, die individuell dazu verwendet werden können, einen Bereich schneller klinischer Untersuchungen, beispielsweise Untersuchungen auf bakterielle Kontamination, Virusinfektion, Spermienbeweglichkeit, Blutparameter, Verunreinigungen in Nahrungsmitteln, Wasser, oder Körperflüssigkeiten und dergleichen einzurichten.

### Zusammenfassung der Erfindung

Die Erfindung liefert Verfahren und Vorrichtungen zur Analyse einer flüssigen Probe. Die Vorrichtung enthält ein festes Substrat, gewöhnlich in einer Dicke von ein paar Millimetern, und einer Fläche von 0,2 bis 2,0 cm<sup>2</sup>, das mikrogenau so hergestellt ist, daß es eine Probeneinlaßöffnung und ein Durchflußsystem im Mesoscale-Maßstab definiert. Das Durchflußsystem im Mesoscale-Maßstab enthält einen Probendurchflußkanal, der sich von der Einlaßöffnung weg erstreckt und einen Flüssigkeitsbehandlungsbereich, der mit dem Durchflußkanal in flüssiger Kommunikation steht. Der Ausdruck "Mesoscale-Maßstab" wird hier dazu verwendet, Kammern und Durchflußdurchgänge zu definieren, die Querschnittsabmessungen im Bereich von 0,1 µm bis 500 µm aufweisen. Die Strömungskanäle im Mesoscale-Maßstab und die Flüssigkeitsbehandlungsbereiche weisen bevorzugte Tiefen im Bereich von 0,1 µm bis 100 µm, im allgemeinen 2 µm bis 50 µm, auf. Die Kanäle haben bevorzugte Weiten im Bereich von 2,0 µm bis 500 µm, mehr bevorzugt 3 µm bis 100 µm. Für viele Anwendungen werden Kanäle mit Weiten mit 5 µm bis 50 µm zweckmäßig sein. Die Kammern in den Substraten werden häufig grössere Abmessungen, beispielsweise einige Millimeter, aufweisen.

Gemäß einer Ausführungsform kann die Vorrichtung dazu verwendet werden, eine Zellen enthaltende, flüssige Probe zu analysieren, und der Flüssigkeitsbehandlungsbereich kann einen Zellenbehandlungsbereich enthalten. Die Vorrichtung kann darüber hinaus Mittel zur Induzierung eines Zellstroms in der Probe durch das Durchflußsystem im Mesoscale-Maßstab enthalten. Der Zellbehandlungsbereich kann Mittel zum Lysieren der Zellen enthalten. Das Strominduzierungsmittel kann dazu verwendet werden, eine Probe von Zellen durch das Zelllyse-mittel zu zwingen, um die Zellen aufzubrechen. Die Mittel können weiterhin in der Vorrichtung zum Nachweis der Anwesenheit

einer interzellulären, molekularen Komponente in einer Zelle der Zellprobe zur Verfügung gestellt werden. Das Mittel zum Lysieren der Zellen kann beispielsweise scharfkantige Stücke aus Silizium, die sich innerhalb des Zellbehandlungsbereichs befinden, oder Membrandurchlöcherungsvorsprünge, die sich von der Wand des Zellbehandlungsbereichs in dem Durchflußsystem im Mesoscale-Maßstab erstrecken, enthalten. Alternativ kann ein Bereich mit einem reduzierten Querschnitt das Zelllyse-mittel enthalten. Das Strömungssystem kann weiter einen mikrogenau hergestellten Filter aufweisen, um beispielsweise zelluläre Debris von der Probe abzufiltrieren, bevor auf Anwesenheit eines intrazellulären Analyten untersucht wird.

Der Zellbehandlungsbereich kann weiter einen Bereich zum Einfangen von Zellen enthalten, der Bindungsstellen aufweist, die ein Oberflächenmolekül reversibel binden können, um die selektive Isolierung einer Zellpopulation aus einer Probe von Zellen zu ermöglichen. Darüber hinaus können stromabwärts des Bereichs zum Einfangen von Zellen Mittel vorgesehen sein, um die Anwesenheit einer Zelle oder eines Zelloberflächemoleküls in der Probe zu bestimmen. In einer anderen Ausführungsform kann der Zellbehandlungsbereich eine inerte Barriere aufweisen, wie Stifte, die sich von einer Wand des Bereichs erstrecken, um ein Sortieren der Zellen nach der Größe zu ermöglichen. Beispielsweise können die Stifte weiter eine Barriere für den Strom einer Spermienprobe enthalten, um die Beweglichkeit von Sperma ermitteln zu können.

Wie hier geoffenbart, enthält das feste Substrat im allgemeinen einen Chip, der das Strömungssystem im Mesoscale-Maßstab enthält. Das Strömungssystem im Mesoscale-Maßstab kann aus Silizium und anderen festen Substraten gebildet und hergestellt sein, wobei bestehende Mikroverarbeitungsverfahren eingesetzt werden. Strömungssysteme im Mesoscale-Maßstab in den Vorrichtungen können durch mikrofeines Erstellen von Strömungskanälen und einem oder mehreren Flüssigkeitsbehandlungsbereichen in die Oberfläche des Substrats

und anschließendem Auflegen eines Deckels, beispielsweise eines transparenten Glasdeckels, über die Oberfläche konstruiert werden. Die Vorrichtungen liegen im allgemeinen in einem Maßstab vor, der zur Analyse einer Probe im Mikrovolumen ( $<10\ \mu\text{l}$ ) geeignet ist, die durch eine Einlaßöffnung, die beispielsweise durch ein Loch, das mit dem Durchflußsystem durch das Substrat oder den Deckel in Verbindung steht, definiert ist. Das Volumen des Durchflußsystems im Mesoscale-Maßstab beträgt im allgemeinen weniger als  $5\ \mu\text{m}$ , und das Volumen der einzelnen Kanäle, Kammern oder anderer funktioneller Elemente beträgt häufig weniger als  $1\ \mu\text{m}$ , beispielsweise im nl- oder pl-Bereich. Zellen oder andere Komponenten, die in den Mikrovolumina einer Probenflüssigkeit in sehr geringen Konzentrationen (beispielsweise Nanogramm-Anteilen) vorhanden sind, können schnell analysiert werden (beispielsweise  $<10$  Minuten).

Die Chips werden gewöhnlich mit einer Vorrichtung verwendet, die zur Festlegung des Chips eine Aufnahmestelle enthält, wobei eine oder mehrere Einlaßöffnung(en) in dem Chip mit einer oder mehreren Strömungsleitung(en) in der Vorrichtung überlagern. Nachdem eine flüssige Probe, beispielsweise eine Zellen enthaltende, flüssige Probe, die einen bestimmten Zelltyp oder eine molekulare Komponente enthalten soll, in die Einlaßöffnung des Substrats gegeben wurde, wird der Chip in die Vorrichtung überführt und eine Pumpe, die sich beispielsweise in der Vorrichtung befindet, wird aktiviert, um die Probe durch das System strömen zu lassen. Alternativ kann eine Probe in den Chip durch die Vorrichtung eingebracht werden. Die Probe kann auch in das Strömungssystem mittels Kapillarkräfte gelangen.

Gemäß einer Ausführungsform kann die Flüssigkeitsbehandlungskammer der Vorrichtung einen Nachweisbereich im Mesoscale-Maßstab aufweisen, der sich stromabwärts des Flüssigkeitsbehandlungsbereichs befindet, um die Anwesenheit eines Analyten in der flüssigen Probe, wie einer zellulären,

intrazellulären oder einer anderen Komponente der flüssigen Probe nachzuweisen. Der Nachweisbereich kann ein gemäß der USSN 07/877702, die am 1. Mai 1992 eingereicht wurde (entspricht PCT WO93/22053, die am 11. November 1993 veröffentlicht wurde), konstruiert sein. Die Vorrichtung kann so ausgebildet sein, daß in dem Nachweisbereich elektronische oder spektrophotometrische Signale erhalten werden, um die Anwesenheit einer vorgewählten Komponente in der Zellprobe anzuzeigen. Die Anwesenheit eines zellulären, intrazellulären oder eines anderen Analyten in dem Nachweisbereich kann auch optisch nachgewiesen werden, beispielsweise durch ein transparentes oder durchsichtiges Fenster, wie einen transparenten Deckel über dem Nachweisbereich, oder durch einen durchsichtigen Bereich des Substrats selbst. Die Vorrichtung kann eine Nachweisausrüstung, wie ein Spektrophotometer, aufweisen, das zum Nachweis der Anwesenheit eines vorbestimmten Analyten in dem Nachweisbereich befähigt ist. Gemäß einer Ausführungsform kann der Nachweisbereich Bindungsgruppen enthalten, die zur Bindung des nachzuweisenden Analyten befähigt sind, wobei der Nachweis verstärkt und erleichtert wird. Der Nachweisbereich kann weiter einen Fraktalbereich, d. h. einen Bereich mit nacheinander abzweigenden Strömungskanälen enthalten, die bezüglich Veränderungen der Strömungseigenschaften einer flüssigen Probe sensitiv sind (veröffentlicht in der USSN 07/877701, die am 1. Mai 1992 eingereicht wurde (entspricht PCT WO93/22054, die am 11. November 1993 veröffentlicht wurde)). Die Vorrichtung kann darüber hinaus mit mindestens drei Einlaßöffnungen hergestellt werden, die mit dem Strömungssystem in flüssiger Kommunikation stehen, die zum Schließen und Öffnen der Öffnungen, um die Steuerung des Flüssigkeitsstroms durch das Strömungssystem im Mesoscale-Maßstab zu ermöglichen, mit Ventilen versehen sind, beispielsweise in einer Vorrichtung, die zusammen mit der Vorrichtung verwendet wird.

Die Vorrichtungen im Mesoscale-Maßstab können dazu angepaßt werden, eine Vielzahl biologischer Untersuchungen durchzuführen. Einige Merkmale und Vorteile der Vorrichtungen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Eine Vorrichtung kann zwei oder mehrere, getrennte Strömungssysteme aufweisen, die beispielsweise durch eine gemeinsame Einlaßöffnung beschickt werden, wobei in jedem System unterschiedliche Zellbehandlungskammern vorhanden sind, um zwei oder mehrere Analysen gleichzeitig durchzuführen. Die Vorrichtungen können zur Durchführung mehrerer schneller Untersuchungen, beispielsweise zum Nachweis der Anwesenheit einer zellulären oder intrazellulären Komponente in einer flüssigen Probe, verwendet werden. Die Vorrichtungen können dazu verwendet werden, beispielsweise pathogene Bakterien oder Viren nachzuweisen, oder zur Zellsortierung. Die Erfindung liefert Verfahren und Vorrichtungen für einen breiten Bereich möglicher Analysen. Die Untersuchungen können schnell durchgeführt werden und nach Beendigung der Untersuchung kann der Chip verworfen werden, was eine Kontamination zwischen den Proben vorteilhaft verhindert, möglicherweise schädliche Materialien beseitigt und billige Analysen von Proben im Mikromaßstab liefert.

Tabelle 1

<u>Merkmal</u>	<u>Vorteil</u>
Flexibilität	keine Begrenzungen bezüglich der Anzahl der Chipanordnungen oder der verfügbaren Anwendungen
Wiederholbarkeit	erlaubt verlässliche, standardisierte Massenproduktion von Chips
Geringe Herstellungskosten	erlaubt ein mit bestehenden Systemen wettbewerbsfähigen Preis. Einweg-Natur für Einweg-Verfahren.
Kleine Größe	keine voluminösen Instrumente erforderlich. Kann in tragbaren Einheiten und Systemen verwendet werden, die zur Verwendung in nicht-herkömmlicher Laborumgebung ausgebildet ist. Minimale Lagerungs- und Verschickungskosten
Mikromaßstab	minimale Proben- und Reagensvolumina erforderlich. Reduziert die Reagenstkosten, insbesondere für teure, spezialisierte Untersuchungsverfahren. Erlaubt einfachen Instrumentenaufbau.
Sterilität	Die Chips können zur Verwendung in mikrobiologischen Untersuchungen und anderen Verfahren, die eine saubere Umgebung erfordern, sterilisiert werden.
Versiegeltes System	Minimum an Bioabfall. Stellt die Verfahrensintegrität sicher.
Viele Kreislaufmöglichkeiten	Möglichkeit, viele Verfahren oder Analysen an einem Chip durchzuführen. Erlaubt Panel-Untersuchungen. Mehrere Möglichkeiten der Ausdehnung der Untersuchungs- und Nachweisverfahren auf im wesentlichen jedes System. Möglichkeit eines breiten Bereichs an Anwendungen. Wiederverwertbare Chips verringern die Kosten pro Verfahren für den Verwender bei bestimmten Anwendungen.

### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

- Fig. 1 ist eine vergrößerte, schematische Ansicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, die ein festes Substrat 14 enthält, auf dem Einlaßöffnungen 16, Strömungskanäle 20 im Mesoscale-Maßstab, eine Zellysekammer 22 und ein Fraktalbereich 40 vorgesehen sind, mit einem transparenten Deckel 12, der auf der Oberfläche des Substrats liegt;
- Fig. 2 ist ein Längsquerschnitt der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung;
- Fig. 3 ist eine perspektivische Ansicht der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung;
- Fig. 4 ist eine schematische Erläuterung der analytischen Vorrichtung 10, die in der Vorrichtung 50 angeordnet ist, die dazu verwendet wird, die Vorrichtung 10 zu stützen und den Druck der Probenflüssigkeit in der Vorrichtung 10 zu regulieren und zu bestimmen;
- Fig. 5 ist eine perspektische Querschnittsansicht eines Flüssigkeitsbehandlungsbereichs 22 auf dem inerten Substrat 14 mit Zellen- oder Debris-Filtervorsprüngen 26, die sich von der Wand des Strömungskanals erstrecken;
- Fig. 6 ist eine Querschnittsansicht eines Flüssigkeitsbehandlungsbereichs 22 auf dem inerten Substrat 14 mit Zellzerstörungsvorsprüngen 24, die sich von der Wand des Kanals erstrecken;

Fig. 7 ist eine schematische Ansicht von oben einer analytischen Vorrichtung 10, die mit einer Reihe von Kammern im Mesoscale-Maßstab hergestellt wurden, die zur Durchführung vieler Funktionen, einschließlich Zellsortierung, Zelllysis und PCR-Analyse geeignet sind;

Fig. 8 bis 10 erläutern unterschiedliche Ausführungsformen eines mikrogenau hergestellten Filters in einem Strömungskanal 20 im Mesoscale-Maßstab;

Fig. 11 ist eine schematische, perspektivische Ansicht einer Vorrichtung 60, die zusammen mit der Vorrichtung 10 zur Beobachtung des Inhalts der Vorrichtung 10 verwendet wird;

Fig. 12 ist eine schematische Querschnittsansicht der Vorrichtung 60 von Fig. 11.

Die gleichen Bezugszeichen in den jeweiligen Figuren bezeichnen die entsprechenden Teile.

#### Ausführliche Beschreibung

Die Erfindung liefert Verfahren und eine Vorrichtung zur Analyse einer flüssigen Probe. Die Vorrichtung umfaßt ein festes Substrat, das mikrogenau so hergestellt ist, daß es eine Probeneinlaßöffnung und ein Durchflußsystem im Mesoscale-Maßstab definiert. Das Durchflußsystem im Mesoscale-Maßstab umfaßt einen Probendurchflußkanal, der sich von der Einlaßöffnung weg erstreckt und einen Flüssigkeitsbehandlungsbereich, der in flüssiger Kommunikation mit dem Durchflußkanal steht. In einer Ausführungsform können die Vorrichtungen dazu verwendet werden, eine Zellen enthaltende, flüssige

Probe zu analysieren. Die Vorrichtungen können beispielsweise zum Nachweis der Anwesenheit einer zellulären oder intrazellulären Komponente in einer Zellenprobe eingesetzt werden.

Analytische Vorrichtungen mit Strömungskanälen und Zellbehandlungskammern im Mesoscale-Maßstab können aus einem festen Substratmaterial in großen Mengen gebildet und hergestellt werden. Sie können leicht sterilisiert werden. Silizium ist aufgrund der ausgereiften Technologie, die dessen genaue und wirksame Herstellung ermöglicht, ein bevorzugtes Material, wobei jedoch andere Materialien verwendet werden können, einschließlich Polymere wie Polytetrafluorethylene. Die Probeneinlaßöffnung und andere Öffnungen, das Strömungssystem im Mesoscale-Maßstab einschließlich des/der Probeneinlaßkanals/ Probeneinlaßkanäle und des/der Flüssigkeitsbehandlungsbereichs/Flüssigkeitsbehandlungsbereiche und andere funktionelle Elemente können in großen Mengen aus einem Siliziumsubstrat durch jede der zahlreichen, den Fachleuten bekannten Verfahren zur Mikroverarbeitung billig hergestellt werden. Die verfügbaren Verfahren zur Mikroverarbeitung beinhalten Filmablagerungsverfahren, wie Wirbelungsbeschichtung und chemische Dampfbeschichtung, Laserverarbeitung oder photolithographische Techniken, wie UV oder Röntgenstrahlenverfahren oder Ätzmethoden, die entweder durch naßchemische Verfahren oder Plasmaverfahren durchgeführt werden können (siehe beispielsweise Manz et al., Trends in Analytical Chemistry 10 (1991), 144-149).

Strömungskanäle unterschiedlicher Weite und Tiefe können in Mesoscale-Dimensionen hergestellt werden. Das Siliziumsubstrat, das einen eingearbeiteten Durchflußkanal im Mesoscale-Maßstab aufweist, kann mit einem dünnen, anodisch gebundenen Glasdeckel überlagert werden. Andere klare oder durchsichtige Abdeckmaterialien können verwendet werden.

Alternativ können zwei Siliziumsubstrate zusammengebracht werden, oder ein Siliziumsubstrat kann zwischen zwei

Glasdeckel gebracht werden. Die Verwendung eines transparenten Deckels führt zu einem Fenster, was eine dynamische Beobachtung des Kanalinhalts erleichtert und eine optische Untersuchung des Durchflußsystems im Mesoscale-Maßstab entweder visuell oder mittels einer Maschine ermöglicht. Andere Herstellungsverfahren können verwendet werden.

Die Kapazität der Vorrichtungen ist sehr klein und die für eine Analyse erforderliche Menge der flüssigen Probe ist daher gering. Beispielsweise beträgt in einem Silikonsubstrat mit 1 cm x 1 cm, das auf seiner Oberfläche eine Anordnung von 500 Vertiefungen mit 10 µm Breite x 10 µm Tiefe x 1 cm ( $10^4$  µm) Länge aufweist, das Volumen jeder Vertiefung  $10^{-3}$  µl und das Gesamtvolumen der 500 Vertiefungen 0,5 µl. Das geringe Volumen der Strömungssysteme im Mesoscale-Maßstab ermöglicht es, daß Untersuchungen an sehr kleinen Mengen einer flüssigen Probe (<5 µl) durchgeführt werden können. Die Strömungssysteme im Mesoscale-Maßstab der Vorrichtung können mit Mikroliter-Volumina oder alternativ Nanoliter-Volumina oder weniger mikrogenau hergestellt werden, was vorteilhaft die Mengen der Probe und/oder der Reagensflüssigkeiten, die für die Untersuchung erforderlich sind, beschränkt. In einer Ausführungsform können Elektronenmikroabbildungen biologischer Strukturen, wie Zirkulationsnetzwerke, als Masken bei der Herstellung der Strömungssysteme im Mesoscale-Maßstab auf dem Substrat verwendet werden. Strömungssysteme im Mesoscale-Maßstab können in vielen Größen und Konformationen hergestellt werden.

Gemäß einer Ausführungsform können die Vorrichtungen dazu verwendet werden, eine Zellen enthaltende, flüssige Probe zu analysieren. Der Flüssigkeitsbehandlungsbereich kann, gemäß einer Ausführungsform, ein Zelllysierungsmittel enthalten, damit die Zellen in einer flüssigen Probe vor der Analyse auf ein intrazelluläres Molekül, wie ein mRNA- oder DNA-Molekül, analysiert werden können. Wie in Fig. 6 erläutert, kann das Zelllysierungsmittel Zellmembran zerstörende Vorsprünge 24

enthalten, die sich von einer Oberfläche des Zellbehandlungsbereichs 22 erstrecken. Die Vorrichtung kann Mittel enthalten, wie eine Pumpe, um einen Strom durch das Durchflußsystem zu induzieren. Wird der Strom durch die Vorsprünge 24 gedrückt, werden die Zellen zerstört. Die Zell-Debris kann abfiltriert werden, wobei ein Filter verwendet wird, das in dem Strömungssystemstrom ab dem Zelllysierungsmittel mikrogenau eingearbeitet wurde. Der Zelllysierungsbereich kann weiter scharfkantige Teilchen, die beispielsweise aus Silizium bestehen, enthalten, die in dem Zellbehandlungsbereich vorkommen. Weiterhin können die Zelllysierungsmittel einen Bereich mit beschränkten Querschnittsabmessungen umfassen, was bei Anwendung eines ausreichenden Strömungsdrucks die Zelllyse bewirkt. In einer anderen Ausführungsform kann das Zelllysierungsmittel ein Mittel zum Lysieren von Zellen enthalten.

Die Vorrichtungen können einen Nachweisbereich im Mesoscale-Maßstab enthalten, der in dem Strömungssystem im Mesoscale-Maßstab mikrogenau eingearbeitet ist und mit dem Zelllysierungsbereich in flüssiger Kommunikation steht und der Bindungsgruppen enthält, die eine ausgewählte, intrazelluläre, molekulare Komponente in der Zellprobe binden können. Die Bindungsgruppen können in den Nachweisbereich über eine Einlaßöffnung eingebracht werden, die mit dem Nachweisbereich in flüssiger Kommunikation steht. Alternativ können Bindungsgruppen in dem Nachweisbereich entweder durch physikalische Absorption auf den Kanaloberflächen oder durch kovalente Bindung an die Kanaloberflächen oder an Festphasenreaktanten, wie polymeren Kügelchen, immobilisiert werden. Im Stand der Technik verfügbare Techniken können zur chemischen Aktivierung von Silikonoberflächen und zur nachfolgenden Anbringung einer bindenden Gruppe an die Oberflächen verwendet werden (siehe beispielsweise Haller in Solid Phase Biochemistry, W. H. Scouten, Hrsg. John Wiley, New York, (1983), 535-597, und Mandenius et al., Anal. Biochem. 137 (1984), 106-114, und Anal. Biochem. 170 (1988), 68-72).

Die Bindungsgruppe im Nachweisbereich kann beispielsweise ein Antigenbindungsprotein, eine DNA-Sonde oder ein Ligand/Rezeptorpaar enthalten, um den Nachweis eines vorgewählten, zellulären, intrazellulären oder eines anderen Analyten, wie eines Antigens, eines Polynukleotids oder eines Zelloberflächenmoleküls zu ermöglichen. Die im Stand der Technik verfügbaren Bindungs-Assays, die in dem Nachweisbereich verwendet werden können, umfassen Immunoassays, enzymatische Assays, Ligand/Binder-Assays und DNA-Hybridisierungsassays. Der Nachweis eines besonderen, intrazellulären Analyten kann durch die Wahl einer geeigneten Bindungsgruppe im Nachweisbereich erfolgen. Der Nachweisbereich kann gemäß den in der USSN 07/877702, die am 1. Mai 1992 eingereicht wurde (entspricht PCT WO93/22053, die am 11. November 1993 veröffentlicht wurde) veröffentlichten Verfahren hergestellt werden.

Der Nachweisbereich im Mesoscale-Maßstab kann weiter einen Bereich enthalten, der gegenüber Veränderungen der Strömungseigenschaften, die durch die Anwesenheit einer vorgewählten zellulären, intrazellulären oder eines anderen Analyten in der flüssigen Probe induziert wird, sensitiv ist. Der gegenüber Strömung sensitive Bereich kann beispielsweise einen Fraktalbereich umfassen, der Verzweigungen aufweist, die zu mehreren Sekundärströmungskanälen führt. Der strömungssensitive Bereich, beispielsweise der Fraktalbereich, kann gemäß der anhängigen, verwandten US-Anmeldung mit der Nummer (Anwaltsüberwachung Nr. UPA002 (8261/3)) auf Strömungsbeschränkung, Analyse basierend hergestellt werden.

Die Vorrichtungen können mehrere Flüssigkeitsbehandlungsbereiche enthalten, um beispielsweise den Nachweis einer vorgewählten intrazellulären oder einer Zelloberflächen-Gruppe in einer Zellen enthaltenden flüssigen Probe zu ermöglichen. Gemäß einer Ausführungsform kann das Strömungssystem im Mesoscale-Maßstab mit einem Zelllysierungsmittel, einem

Filter zum Abfiltrieren von Zell-Debris und einem Nachweisbereich mikrogenau hergestellt werden. Der Filter kann in dem Strömungssystem zwischen dem Zelllysierungsmittel und dem Nachweisbereich mikrogenau eingearbeitet werden, um die Entfernung der lysierten Zellmembran und anderer Komponenten der Zell-Debris von der Probe vor Nachweis eines intrazellulären Analyten in dem Nachweisbereich zu ermöglichen. Filter, die in dem Strömungssystem mikrogenau eingearbeitet werden können, enthalten die in den Fig. 8 bis 10 gezeigten Filter. In der Vorrichtung 10, die in den Fig. 8 bis 10 gezeigt ist, ist der Filter 80 zwischen den Strömungskanälen 20a und 20b mikrogenau eingearbeitet, damit die flüssige Probe im Kanal 20a durch den Filter gelangen kann. Das Filtrat tritt durch den Filter im Kanal 20b aus, woraus es nachfolgend in beispielsweise einem Nachweisbereich im Mesoscale-Maßstab analysiert wird. Der Filter ist ein Strömungskanal im Mesoscale-Maßstab mit im Vergleich zu Kanal 20 verringertem Durchmesser, der bezüglich Tiefen und Weiten im Bereich von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 20  $\mu\text{m}$  mikrogenau eingearbeitet ist. Im Gegensatz dazu weisen die Strömungskanäle 20a und 20b vergrößerte Weiten und Tiefen im Bereich von maximal etwa 500  $\mu\text{m}$  auf. Der kleinere Durchmesser des Filters 80 ermöglicht, daß gescherte Zellmembrane und andere Zell-Debris von der Probe abfiltriert werden kann. Andere Filtrationsmittel können verwendet werden, wie die Stifte 26, die sich von einer Wand des Strömungskanals 20, der in Fig. 5 gezeigt ist, erstrecken.

Die Anwesenheit eines Analyten in dem Nachweisbereich kann durch mehrere Verfahren nachgewiesen werden, einschließlich einer Überwachung des Drucks oder der elektrischen Leitfähigkeit der Probenflüssigkeiten in gewählten Bereichen des Strömungssystems in der Vorrichtung, oder durch optischen Nachweis durch einen transparenten Deckel oder einen durchsichtigen Bereich des Substrats selbst, entweder visuell oder maschinell. Der Nachweis eines Analyten in dem Nachweisbereich

kann dergestalt durchgeführt werden, wie es in den anhängigen, verwandten Anmeldungen USSN 07/877702, die am 1. Mai 1992 eingereicht wurde (entspricht PCT WO93/22053, die am 11. November 1993 veröffentlicht wurde) und USSN 07/877701, die am 1. Mai 1992 eingereicht wurde (entspricht PCT WO93/22054, die am 11. November 1993 veröffentlicht wurde), offenbart ist. Vorrichtungen, wie Ventile, Drucksensoren im Mesoscale-Maßstab und andere mechanische Sensoren, können direkt auf das Siliziumsubstrat eingearbeitet werden und können gemäß bestehender Technologien in Massen produziert werden. Angell et al., Scientific American 248 (1983), 44-55. Die Drucksensoren und andere Nachweismittel können darüber hinaus in einer Vorrichtung vorgesehen sein, die zusammen mit der Vorrichtung verwendet wird.

In einer anderen Ausführungsform kann der Flüssigkeitsbehandlungsbereich einen Zell-Einfangbereich enthalten, um eine vorgewählte Zellpopulation von einer Zellen enthaltenden, flüssigen Probe zu trennen, um eine nachfolgende Analyse auf ein Makromolekül auf oder in den Zellen oder auf eine Komponente in der extrazellulären Flüssigkeit zu ermöglichen. Der Zell-Einfangbereich kann Bindungsgruppen enthalten, die zur reversiblen Bindung einer Zielzelle über ein charakteristisches Zelloberflächenmolekül, wie ein Protein, befähigt ist. Gemäß einer Ausführungsform kann der Zell-Einfangbereich dazu verwendet werden, eine vorgewählte Zellpopulation aus einer Zellen enthaltenden flüssigen Probe zu isolieren. In dieser Ausführungsform ist die Vorrichtung mit Mitteln zum Induzieren eines Stroms der Probe durch das Strömungssystem, wie einer Pumpe, versehen. Bei geringem Strömungsdruck binden die Zellen an die Bindungsgruppen in dem Zell-Einfangbereich. Die Strömung wird dann fortgesetzt, um die Zellen mit beispielsweise einem Puffer zu waschen. Bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten und -drücken werden die gewaschenen Zellen von dem Trennbereich befreit und bewegen sich zur Analyse

stromabwärts in beispielsweise einen Nachweisbereich im Mesoscale-Maßstab. Gemäß einer anderen Ausführungsform verbleiben die Zellen immobilisiert, während die extrazelluläre Flüssigkeit stromabwärts fließt und in beispielsweise in einem Nachweisbereich im Mesoscale-Maßstab analysiert wird. Die gebundenen Zellen können weiter von dem Zell-Einfangbereich dadurch entfernt werden, daß ein spezifisches Lösungsmittel durch das Strömungssystem fließt, das die Zellen von der Wand des Zell-Einfangbereichs desorbieren kann.

Die Bindungsgruppe, die die Zellen in dem Zell-Einfangbereich binden kann, beispielsweise über ein Zelloberflächenmolekül, kann auf der Oberfläche der Strömungskanäle im Mesoscale-Maßstab durch physikalische Absorption auf den Kanaloberflächen oder durch chemische Aktivierung der Oberfläche und nachfolgende Bindung von Biomolekülen an die aktivierte Oberfläche immobilisiert werden. Im Stand der Technik verfügbare Techniken können zur chemischen Aktivierung von Silizium-Kanaloberflächen und zur nachfolgenden Bindung einer Bindungsgruppe an die Oberflächen verwendet werden (siehe beispielsweise Haller in Solid Phase Biochemistry, W. H. Scouten, Hrsg. John Wiley, New York (1983), 535-597 und Mandenius et al., Anal. Biochem. 137 (1984), 106-114 und Anal. Biochem. 170 (1988), 68-72). Die Bindungsgruppe kann in dem Zell-Einfangbereich des Strömungssystems im Mesoscale-Maßstab vorgesehen sein, wie in der USSN 07/877702, die am 1. Mai 1992 eingereicht wurde (entspricht PCT WO93/22053, die am 11. November 1993 veröffentlicht wurde), offenbart ist. Das Einfangen eines bestimmten Zelltyps kann durch Wahl einer geeigneten Bindungsgruppe erfolgen.

Wie in Fig. 5 erläutert, kann der Zellbehandlungsbereich 22 Vorsprünge 26 enthalten, die zur Trennung der Zellen nach der Größe ein zelluläres Sieb darstellen. Sobald die Zellprobe, gewöhnlich bei geringem Druck, durch die Strömungskanäle zirkuliert, gelangen nur Zellen in den Strömungskanal, die zwischen den Vorsprüngen 26 durchtreten können.

Die Vorrichtungen können mehrere unterschiedliche Zellbehandlungsbereiche in dem Strömungssystem im Mesoscale-Maßstab einer Vorrichtung umfassen. Gemäß einer Ausführungsform, die in den Fig. 1, 2 und 3 schematisch erläutert wird, kann die Vorrichtung 10 ein Siliziumsubstrat 14 enthalten, in das ein Strömungskanal 20 im Mesoscale-Maßstab, eine Zelllyisierungskammer 22 und der Fraktalnachweisbereich 40 mikrogenau eingearbeitet wurde. Die Vorrichtung kann dazu verwendet werden, die Anwesenheit einer vorbestimmten intrazellulären Komponente einer Zellprobe nachzuweisen. Die Zelllyisierungskammer 22 ist mit Zellmembrane zerstörenden Vorsprüngen 24 versehen. Durch die Einlaßöffnung 16A kann die Probenflüssigkeit in das Strömungssystem gegeben werden. Eine Pumpe in der Vorrichtung kann dann dazu verwendet werden, eine Zellenprobe durch den Strömungskanal 20A zu der Zelllyisierungskammer 22 zu bringen. Die lysierte Zellenprobe wird dann mittels Filter 28 filtriert und strömt durch den Fraktalnachweisbereich 40 auf die Öffnung 16B zu. Das Substrat 14 ist mit einem Glas oder einem Plastikfenster 12 bedeckt. Die Anwesenheit eines intrazellulären Analyten wird durch den Nachweis, beispielsweise optisch, der Strömungsbeschränkung in dem Fraktalnachweisbereich, die durch den speziellen intrazellulären Analyten induziert wird, angezeigt. Der Fraktalbereich kann Bindungsgruppen enthalten, die zur Bindung des Analyten befähigt sind, um die Strömungsbeschränkung in dem Fraktalbereich 40 zu erhöhen.

Die analytischen Vorrichtungen, die das Strömungssystem im Mesoscale-Maßstab enthalten, können in Kombination mit einer Vorrichtung zur Lieferung und Aufnahme von Flüssigkeiten zu und von den Vorrichtungen, wie die Vorrichtung 50, die in Fig. 4 schematisch gezeigt ist, und die eine Aufnahme- und Abgabestelle 58 für die Vorrichtung 10 und für Anzeigeöffnungen, beispielsweise Öffnungen 16 in der Vorrichtung 10, mit einer Stromleitung 56 in der Vorrichtung verwendet werden. Die Vorrichtung

kann Mittel, wie eine Pumpe, enthalten, um eine Zellen enthaltende Probe in ein Zelllysierungsmittel zu bringen, um bei Anwendung eines ausreichenden Strömungsdrucks eine Lyse der Zellen zu bewirken. Nachdem eine Zellen enthaltende, flüssige Probe, die einen bestimmten zellulären Analyten enthalten soll, in die Einlaßöffnung 51 der Vorrichtung eingebracht wurde, wird die Pumpe 52 aktiviert, um die Probe durch das Strömungssystem 20 der Vorrichtung 10 zu bringen. Alternativ, je nach der verwendeten analytischen Vorrichtung, kann die Probe in die Vorrichtung injiziert werden oder kann in das Strömungssystem einfach mittels Kapillarkräfte eintreten. In einer Ausführungsform können die Strömungssysteme der Vorrichtungen vollständig gefüllt sein und die Vorrichtung kann dazu verwendet werden, einen flüssigen Strom durch das Strömungssystem zu bringen.

Die Analysevorrichtungen können weiter zusammen mit einer Vorrichtung zum Beobachten des Inhalts der Kanäle im Mesoscale-Maßstab in den Vorrichtungen verwendet werden. Die Vorrichtung gemäß einer Ausführungsform kann ein Mikroskop enthalten, um den Inhalt der Kanäle im Mesoscale-Maßstab in den Vorrichtungen zu beobachten. Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann eine Kamera in der Vorrichtung enthalten sein, wie in der Vorrichtung 60, die in den Fig. 11 und 12 schematisch gezeigt, erläutert ist. Die Vorrichtung 60 ist mit einem Gehäuse 62, einer Sichtscheibe 64 und einer Öffnung 66 zum Einbringen eines Chips in die Vorrichtung versehen. Wie in dem Querschnitt in Fig. 12 gezeigt, enthält die Vorrichtung 60 weiter eine Videokamera 68, ein optisches System 70 und einen Kippmechanismus 72 zur Aufnahme der Vorrichtung 10, damit die Anordnung und der Winkel der Vorrichtung 10 manuell eingestellt werden kann. Das optische System kann ein Linsensystem zur Vergrößerung des Inhalts der Kanäle sowie eine Lichtquelle enthalten. Die Videokamera 68 und die Scheibe 64 ermöglichen es, daß durch den Analyten induzierte Veränderungen in

den Probenflüssigkeitseigenschaften, wie Strömungseigenschaften oder Farbe, visuell beobachtet und gegebenenfalls unter Verwendung der Vorrichtung aufgezeichnet werden können.

Die erfindungsgemäßen Vorrichtungen können dazu verwendet werden, eine Vielzahl automatisierter, sensitiver und schneller Analysen einer flüssigen Probe durchzuführen. Die Vorrichtung kann mit einer Reihe von Flüssigkeitsbehandlungsbereichen in einem Strömungssystem hergestellt werden, um die schnelle, wirksame Mehrschritt-Analyse einer flüssigen, Zellen enthaltenden Probe im Mikrovolumen-Maßstab zu ermöglichen. Die Vorrichtungen können weiter zwei oder mehrere, getrennte Strömungssysteme, beispielsweise mit einer gemeinsamen Einlaßöffnung, enthalten, wobei ein Strömungssystem als Kontrolle ausgelegt ist, so daß die während einer Analyse erhaltenen Daten mit den Daten des Kontrollströmungssystems verglichen werden können. Eine Vielzahl von Analysen können daher in einer Vorrichtung durchgeführt werden.

Gemäß einer Ausführungsform kann die erfindungsgemäße Vorrichtung drei oder mehrere Einlaßöffnungen und einen Verzweigungsströmungskanal, der mit den Öffnungen in flüssiger Kommunikation steht, aufweisen. Die Vorrichtung kann mit Ventilen versehen sein, beispielsweise in der Vorrichtung, um die Öffnungen zu öffnen und zu schließen, um den Flüssigkeitsstrom durch das Strömungssystem zu steuern. Wie in der Vorrichtung 10 erläutert, die in der Fig. 7 schematisch gezeigt ist, können die Öffnungen 16A, 16B, 16C und 16D mittels der Ventile unabhängig voneinander in beispielsweise einer zusammen mit der Vorrichtung verwendeten Vorrichtung geöffnet oder geschlossen werden, damit die Flüssigkeit in dem Strömungssystem, beispielsweise über die Öffnung 16 hinaus oder alternativ zu dem Fraktalnachweisbereich 40 und der Öffnung 16D geleitet werden kann.

Die Erfindung wird weiter aus den folgenden, nicht begrenzenden Beispielen verständlich.

### Beispiel 1

Ein Kanal mit einer Barriere 26 mit 7  $\mu\text{m}$  Lücken (im Querschnitt in Fig. 5 erläutert) wird mit HTF-BSA-Medium und einer Samenprobe, die am Eingangsloch eingebracht wird, gefüllt. Die Wanderung der Spermien durch die Barriere dient als Indikator der Spermien-Beweglichkeit und wird mit einer Kontrollprobe verglichen.

### Beispiel 2

Fig. 7 zeigt schematisch eine Vorrichtung 10, die ein Substrat 14 enthält, das zur Trennung und zum Nachweis einer Nukleinsäure aus einer Sub-Population von Zellen in einem Gemisch in einer biologischen, flüssigen Probe verwendet wird. Auf der Vorrichtung 10 ist ein Strömungsweg 20 mikrogenau eingearbeitet, der eine Zellentrennungskammer 22A, eine Zell-lyisierungskammer 22B, einen Filterbereich 28, eine Polymerasekettenreaktions- (PCR)-Kammer, die die Bereiche 22C und 22D umfaßt, und einen Fraktalnachweisbereich 40 enthält. Das Strömungssystem im Mesoscale-Maßstab 20 ist darüber hinaus mit Eintritts/Austritts-Öffnungen für Flüssigkeiten 16A, 16B, 16C und 16D versehen. Die Vorrichtung wird zusammen mit einer Vorrichtung, wie einer Vorrichtung 50, die in Fig. 4 gezeigt ist, verwendet. Die Vorrichtung ist mit Flüssigkeitskanälen versehen, die mit den Öffnungen 16 in der Vorrichtung übereinstimmen, und mit Ventilen, die ein mechanisches Öffnen und Schließen der Öffnungen 16 erlauben. Die Vorrichtung enthält weiter eine Pumpe 52 zur Regulierung des Stroms der flüssigen Probe durch die Vorrichtung. Die Vorrichtung enthält darüber hinaus Mittel zum Erhitzen der PCR-Reaktionskammerbereiche 22C und 22D in der Vorrichtung.

Am Anfang werden die Ventile in der Vorrichtung dazu verwendet, die Öffnungen 16C und 16D zu schließen, während die

Öffnungen 16A und 16B offen sind. Eine Probe, die ein Zellengemisch enthält, wird zu der Probeneinlaßöffnung 16A mittels der Pumpe 52 in der Vorrichtung gebracht, und strömt durch den Strömungsweg 20 im MesoscaleMaßstab zu der Trennkammer 22A.

Die Kammer 22A enthält Bindungsgruppen, die an der Wand der Kammer immobilisiert sind und die ein Oberflächenmolekül eines gewünschten Zelltyps in der Probe binden. Die verbleibenden zellulären Komponenten treten über die Öffnung 16B aus dem Substrat aus. Nach Binden der gewünschten Zellpopulation in der Kammer 22A wird ein Pufferstrom fortgesetzt, um zu waschen und eine Isolierung der Zellpopulation sicherzustellen. Anschließend wird die Öffnung 16B geschlossen und 16C wird geöffnet. Der Strom wird dann in ausreichendem Maß erhöht, um die immobilisierten Zellen freizusetzen. Die Strömung wird fortgesetzt, wobei die Zellen durch die Membranzerstörungsvorsprünge 24 in der Kammer 22B gezwungen werden, wobei die Zellen aufgerissen werden und intrazelluläres Material freigesetzt wird.

Der Probenstrom passiert den Filter 28, wobei große zelluläre Membrankomponenten und andere Debris abfiltriert werden, weiter in den PCR-Kammerbereich 22C im Mesoscale-Maßstab, der mit dem PCR-Kammerbereich 22D über den Strömungskanal 20B verbunden ist. Anschließend wird Taq-Polymerase, Primer und andere für den PCR-Assay erforderliche Reagentien zu dem Bereich 22D durch die Öffnung 16C aus einer übereinstimmenden Öffnung und einem übereinstimmenden Kanal in der Vorrichtung zugegeben, wobei ein Mischen der intrazellulären, löslichen Komponenten der abgetrennten Sub-Population der Zellen und der PCR-Reagentien ermöglicht wird. Während die Öffnung 16A geschlossen ist, wird eine Pumpe in der Vorrichtung, die über die Öffnung 16B verbunden ist, dazu verwendet, die PCR-Probe und die Reagentien durch den Strömungskanal 20B zwischen den Bereichen 22C und 22D, die auf 94 °C bzw. 65 °C eingestellt

sind, zu zirkulieren, um viele Polynukleotidschmelz- und -polymerisationszyklen durchzuführen, was eine Amplifizierung des Polynukleotidprodukts ermöglicht. Die PCR-Analyse im Meso-scale-Maßstab wird gemäß den in der USSN 07/877662, die am 1. Mai 1992 eingereicht wurde (entspricht PCT WO93/22058, die am 11. November 1993 veröffentlicht wurde), offenbarten Verfahren durchgeführt.

Die Ventile in der Vorrichtung werden anschließend dazu verwendet, die Öffnung 16C zu schließen und die Öffnung 16D zu öffnen. Die Pumpe in der mit der Öffnung 16B verbundenen Vorrichtung wird dann dazu verwendet, das amplifizierte Polynukleotid, das von der Zellpopulation isoliert wurde, in den Fraktalnachweisbereich 40 zu bringen. Die Strömungsbeschränkung in dem Fraktalbereich 40 dient als positiver Indikator der Anwesenheit eines amplifizierten Polynukleotidprodukts, das optisch durch einen Glasdeckel, der über den Nachweisbereich angeordnet ist, nachgewiesen wird.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Vorrichtung zum Analysieren einer flüssigen, zellenhaltigen Probe, wobei die Vorrichtung umfaßt:

ein festes Substrat, das mikrogenau so hergestellt ist, daß es definiert:

eine Probeneinlaßöffnung; und

ein Durchflußsystem mit Mesoscale-Maßstab, das durch Kammern und Durchflußdurchgänge mit Querschnittsabmessungen von etwa 0,1 bis 500  $\mu\text{m}$  definiert ist, worin Kammern im Substrat auch größere Abmessungen von einigen Millimetern haben können, wobei das Durchflußsystem im Mesoscale-Maßstab umfaßt:

einen Probendurchflußkanal, der sich von der Einlaßöffnung weg erstreckt; und

einen Zellenbehandlungsbereich zur Behandlung von Zellen, der in Flüssigkommunikation mit dem Durchflußkanal angeordnet ist, wobei der Zellenbehandlungsbereich eine Zell-Lyse-Struktur umfaßt;

Mittel zum Induzieren einer Zellenströmung in einer Probe durch den Durchflußkanal im Mesoscale-Maßstab und den Zellenbehandlungsbereich, um Zellen in der Probe in Kontakt mit der Zell-Lyse-Struktur zu drängen und dadurch Zellen in der Probe zu lysieren; und

stromabwärts von der Zell-Lyse-Struktur angeordnete Mittel zum Detektieren eines Analyten in der lysierten Zellprobe.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, worin die Zell-Lyse-Struktur umfaßt:

(a) einen Abschnitt des Durchflußkanals mit zellmembran-durchstoßenden Vorsprüngen, die sich von seiner Wand weg erstrecken; und

(b) scharfkantige Teilchen, die innerhalb des Zellbehandlungsbereichs eingeschlossen sind; oder

(c) einen Bereich mit eingeschränktem Querschnitt, der ausreicht, um das Hindurchtreten intrazellulärer Moleküle zu ermöglichen, während das Hindurchtreten von Zellen verhindert wird.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, worin das Detektionsmittel stromabwärts von der Zell-Lyse-Struktur befindliche Mittel zum Nachweis der Gegenwart einer intrazellulären, molekularen Komponente einer Zelle in der Probe umfaßt.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die weiters stromabwärts von der Zell-Lyse-Struktur angeordnete Mittel zum Sammeln unlöslicher Zellbruchstücke umfaßt.

5. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, die weiters ein stromabwärts von der Zell-Lyse-Struktur angeordnetes Filtermittel umfaßt.

6. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Zellenbehandlungsbereich weiters einen Zelleinfangbereich umfaßt, der immobilisierte Bindungsstellen umfaßt, die ein vorgewähltes Zelloberflächenmolekül einer Zellpopulation in einer zellenhaltigen, flüssigen Probe reversibel binden; und

worin das Flußinduktionsmittel Mittel zum Herbeiführen des Flusses der zellenhaltigen Probe umfaßt:

mit einer ersten Flußrate, die ausreichend langsam ist, um das Einfangen von Zellen in der Zellpopulation durch die Bindungsstellen zu ermöglichen, wodurch die Zellpopulation von der Probe abgetrennt wird; und

mit einer zweiten Flußrate, die höher ist als die erste Flußrate und ausreicht, um die abgetrennten Zellen aus dem Einfangbereich freizusetzen und die abgetrennten Zellen an die Zell-Lyse-Struktur weiterzuleiten.

7. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Detektionsmittel stromabwärts vom Zelleinfangbereich befindliche Mittel zum Nachweis der Gegenwart einer extrazellulären Komponente der Probe umfaßt.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin das Detektionsmittel Mittel zum Nachweis der Gegenwart einer intrazellulären Komponente in den eingefangenen Zellen umfaßt.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, die weiters zwischen dem Zell-Lyse-Mittel und dem Detektionsmittel angeordnete Filtermittel zum Abfiltrieren von Zellbruchstücken aus der Probe umfaßt.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, die weiters einen angrenzend an den Filter angeordneten Sumpf zum Sammeln unlöslicher Bruchstücke umfaßt.

11. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Zellbehandlungsstruktur weiters ein Zellsieb umfaßt, das Mittel umfaßt, die eine Vielzahl an Durchflußdurchgängen mit eingeschränkter Größe definieren, welche nur Zellen mit einem ausreichend kleinen Durchmesser passieren lassen.

12. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Substrat mikrogenau hergestelltes Silizium umfaßt.

13. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, die weiters eine Vorrichtung zur Verwendung in Kombination mit dem Substrat umfaßt, wobei die Vorrichtung umfaßt:

Mittel zum Halten des Substrats; und

Flüssigkeitszufuhrmittel, die an eine Einlaßöffnung des Substrats angepaßt sind; und

worin das Flußinduktionsmittel in der Vorrichtung angeordnete Pumpmittel zum Hindurchschicken von Flüssigkeit durch das Durchflußsystem des Substrats umfaßt, wenn diese im Haltemittel gehalten wird.

14. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Detektionsmittel eine Vorrichtung zur Verwendung in Kombination mit dem Substrat umfaßt, wobei die Vorrichtung umfaßt:

Mittel zum Halten des Substrats; und

optische Mittel zum Betrachten des Inhalts des Durchflußsystems mit Mesoscale-Maßstab im Substrat.

15. Vorrichtung nach Anspruch 14, worin das optische Mittel eine Vergrößerungsoptik und eine Videokamera umfaßt und worin die Vorrichtung weiters umfaßt:

einen Kippmechanismus zum manuellen Einstellen des Winkels und der Position der Vorrichtung; und

einen Videobildschirm zum Betrachten des Inhalts des Durchflußsystems.

16. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Durchflußsystem mit Mesoscale-Maßstab weiters umfaßt:

eine in Flüssigkommunikation mit dem Durchflußkanal stehende Kanalverzweigung;  
und

zumindest zwei zusätzliche Öffnungen, die mit dem Durchflußkanal bzw. der Kanalverzweigung und dem Außenraum des Durchflußkanals kommunizieren; und

worin die Vorrichtung weiters Ventilmittel umfaßt, um den Fluß durch das Durchflußsystem hindurch zu einer gewählten zusätzlichen Öffnung hin zu führen.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, die weiters eine Vorrichtung zur Verwendung in Kombination mit dem Substrat umfaßt, wobei die Vorrichtung umfaßt:

Mittel zum Halten des Substrats;

Flüssigkeitsflußkanäle, die an zumindest zwei der Öffnungen angepaßt sind, wenn das Substrats im Haltemittel gehalten wird; und

worin das Flußinduktionsmittel Pumpmittel umfaßt, die innerhalb der Vorrichtung in Flüssigkommunikation mit den Einlaßöffnungen angeordnet sind, um innerhalb des Durchflußsystems eine Strömung zu induzieren.

18. Vorrichtung nach Anspruch 16 oder 17, worin das Ventilmittel innerhalb der Vorrichtung angeordnet ist.

19. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Detektionsmittel umfaßt:

zumindest zwei Analyten-Detektionsbereiche im Durchflußsystem in Flüssigkommunikation mit der Zellenbehandlungsstruktur, wobei einer der Detektionsbereiche dazu ausgebildet ist, eine Probe zu analysieren, und der andere als Vergleich vorgesehen ist; und

worin das Flußinduktionsmittel Mittel zum Herbeiführen des Flusses einer Probe durch die Zellenbehandlungsstruktur hindurch und dann zu den beiden Detektionsbereichen hin umfaßt, wodurch ein Vergleich der Daten aus den Detektionsbereichen möglich wird.

20. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Detektionsmittel einen Detektionsbereich innerhalb des Durchflußsystems mit Mesoscale-Maßstab zur optischen oder elektrischen Datenerfassung umfaßt, die Aufschluß über die Gegenwart oder die Konzentration eines Analyten in einer innerhalb des Durchflußsystems enthaltenen Probe geben.

21. Vorrichtung zum Analysieren einer flüssigen, zellenhaltigen Probe, wobei die Vorrichtung umfaßt:

ein festes Substrat, das mikrogenau so hergestellt ist, daß es definiert:

eine Probeneinlaßöffnung; und

ein Durchflußsystem mit Mesoscale-Maßstab, das durch Kammern und Durchflußdurchgänge mit Querschnittsabmessungen von etwa 0,1 bis 500  $\mu\text{m}$  definiert ist, worin Kammern im Substrat auch größere Abmessungen von einigen Millimetern haben können, wobei das Durchflußsystem mit Mesoscale-Maßstab umfaßt:

einen Probendurchflußkanal, der sich von der Einlaßöffnung weg erstreckt; und

einen Zellenbehandlungsbereich zur Behandlung von Zellen, der in Flüssigkommunikation mit dem Durchflußkanal angeordnet ist, wobei der Zellenbehandlungsbereich eine Zell-Lyse-Struktur umfaßt;

Mittel zum Herbeiführen des Flusses von Zellen in einer Probe durch den Durchflußkanal mit Mesoscale-Maßstab und den Zellenbehandlungsbereich, um Zellen in der Probe in Kontakt mit dem Zell-Lyse-Mittel zu drängen und dadurch Zellen in der Probe zu lysieren; und

stromabwärts vom Zellenbehandlungsbereich angeordnete Mittel zum Detektieren eines Analyten in der lysierten Zellprobe.

22. Verfahren zum Abtrennen einer Ziel-Subpopulation von Zellen in einer zellenhaltigen, flüssigen Probe, folgende Schritte umfassend:

(A) das Bereitstellen eines Probenflußdurchgangs mit Mesoscale-Maßstab mit Querschnittsabmessungen von etwa 0,1 bis 500  $\mu\text{m}$ , der eine feste Wand umfaßt, auf der ein Bindeprotein immobilisiert ist, das für ein an die Zellmembran gebundenes Protein, welches für die Zielpopulation charakteristisch ist, spezifisch ist;

(B) das Hindurchschicken einer zellenhaltigen, flüssigen Probe durch den Durchgang unter Bedingungen, die das Einfangen von Vertretern der Ziel-Zellsubpopulation durch reversible Bindung des Proteins an immobilisiertes Zelloberflächenprotein, während andere Zellen hindurchgehen können; und

(C) das Ändern der Bedingungen im Flußdurchgang, um die Ziel-Subpopulation der Zellen freizusetzen, ermöglichen.

23. Verfahren nach Anspruch 22, worin in Schritt C die Flußrate der Flüssigkeit im Flußdurchgang erhöht wird, um die Zellen von der festen Wand abzuscheren.
24. Verfahren nach Anspruch 22, worin Schritt C durchgeführt wird, indem ein Lösungsmittel in den Durchflußkanal eingebracht wird, das die Zellen von der festen Wand desorbiert.

FIG. 1

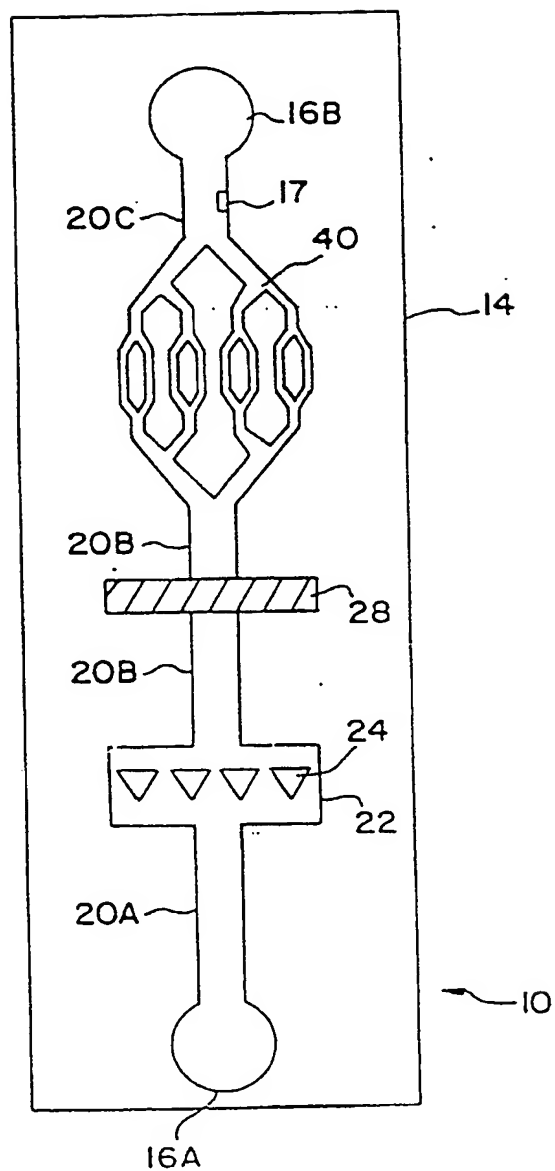


FIG. 2

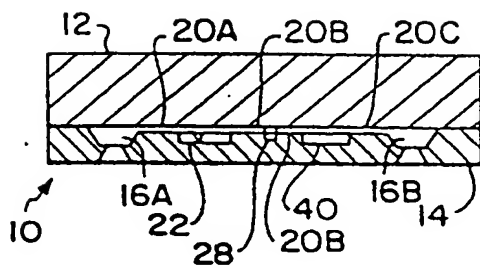


FIG. 3

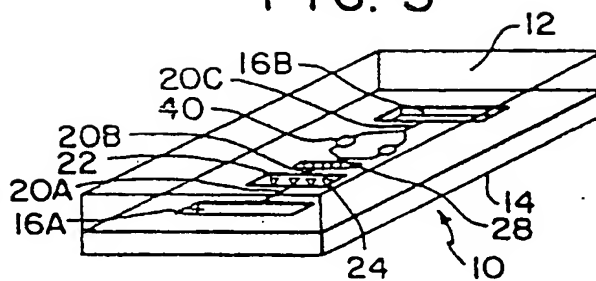


FIG. 4

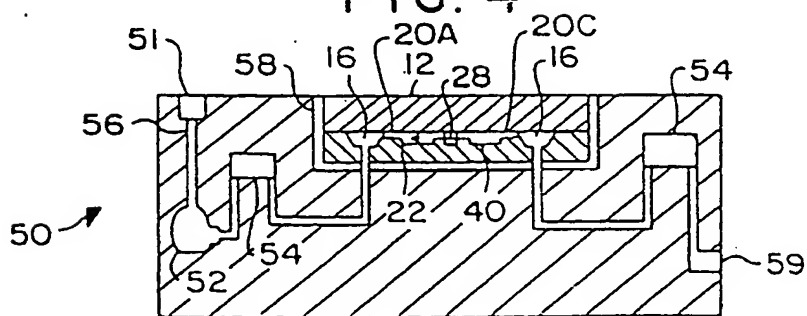


FIG. 5

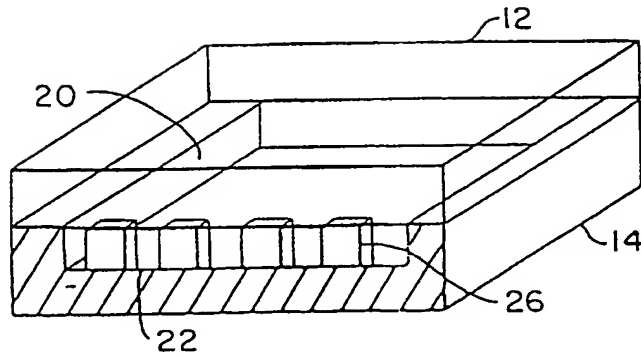


FIG. 6

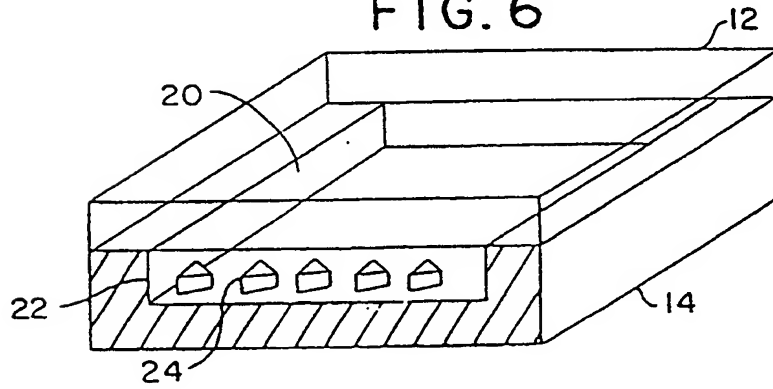


FIG. 7

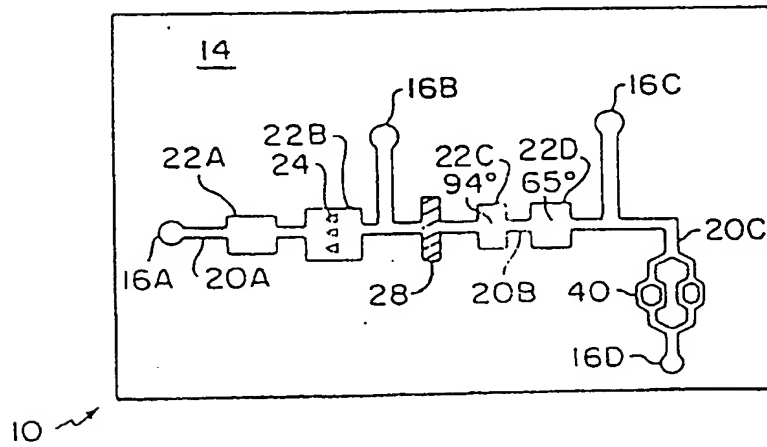


FIG. 8

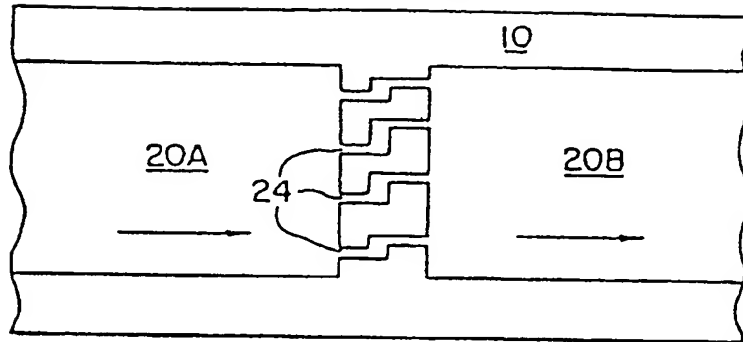


FIG. 9

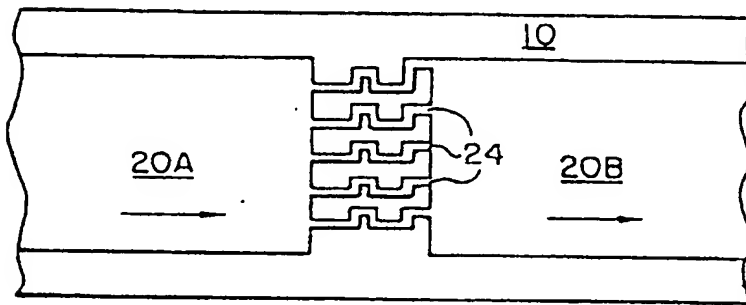


FIG. 10

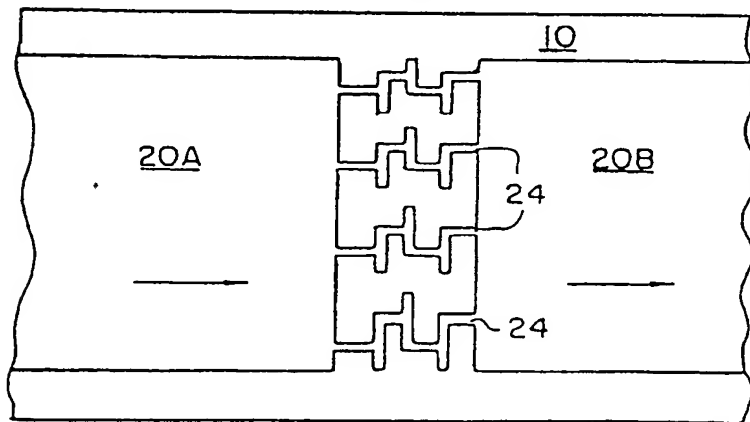


FIG. 12

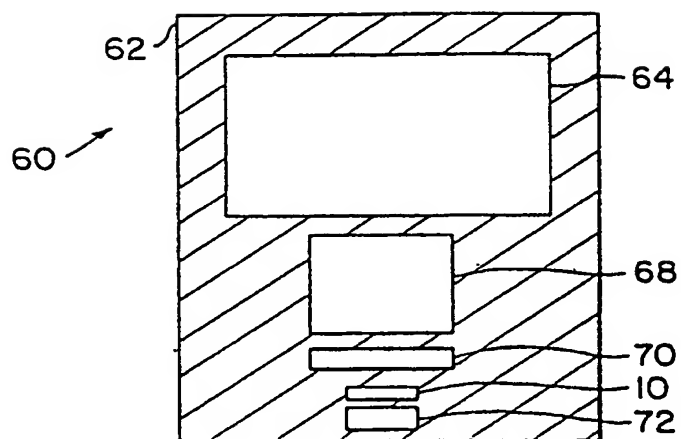
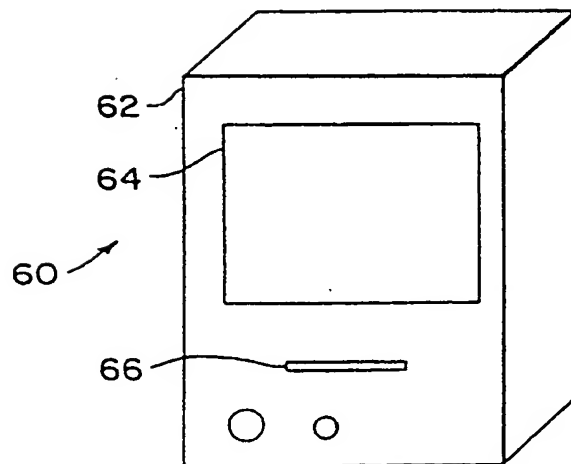


FIG. 11



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**